

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr Anny Empel pt. „Synteza nowych diazafenotiazynowych pochodnych pirydyny i ich właściwości cytotoksyczne” wykonanej w Katedrze i Zakładzie Chemii Organicznej Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach

Choroby nowotworowe pomimo całej gamy leków i terapii wciąż pozostają dla nas wyzwaniem. Szukamy nowych leków, bardziej skutecznych, a jednocześnie bardziej selektywnych, obciążonych jak najmniejszą ilością działań niepożądanych.

Pochodne fenotiazyny znajdują się w kręgu zainteresowań naukowców sosnowieckiego ośrodka naukowego od wielu lat. W literaturze jest wiele doniesień na temat ich aktywności przeciwnowotworowej. Wobec powyższego wybór tematu pracy doktorskiej jest aktualny i interesujący, o możliwych walorach praktycznych.

Przedstawiona do recenzji praca doktorska jest opracowana w sposób klasyczny. Zawiera wstęp, założenia i cel pracy, materiały i metody, wyniki, dyskusję, wnioski, streszczenie oraz piśmiennictwo.

W części wstępnej Autorka opisuje budowę fenotiazyn oraz podstawowe metody syntezy układu fenotiazynowego. Ponadto, przedstawia przegląd literatury na temat badań nad mechanizmami aktywności przeciwnowotworowej pochodnych fenotiazyny. Ta część pracy opiera się na 189 pozycjach literaturowych.

Założenia i cele realizowanej pracy badawczej opisane są w sposób właściwy i klarowny. Celem nadrzędnym było otrzymanie szeregu nowych tetracyklicznych pochodnych fenotiazyn, zawierających w swojej strukturze podstawniki pirydynowy oraz chinolinowy o potencjalnej aktywności przeciwnowotworowej.

W pierwszym etapie pracy Pani Anna Empel podjęła próbę otrzymania chlorków 5-metylo-12*H*-chino[3,4-*b*]pirydo[5,6-*e*][1,4]tiazyniowych oraz 5-metylo-12*H*-chino[3,4-*b*]pirydo[3,4-*e*][1,4]tiazyniowych w reakcjach bis-chlorku 5,12-(dimetylo)tiochinantrenodiinowego z trzynastoma różnymi pochodnymi 3-aminopirydyny. Pierwszy etap reakcji prowadzi do

otrzymania odpowiednich tiolanów, które następnie mogą ulegać cyklizacji do pochodnych pirydochinotiazyniowych, zawierających atom azotu w pozycji 8- lub 10. Wykazano, że kierunek reakcji zależał od rodzaju podstawników w pierścieniu pirydyny. Nie udało się uzyskać tą metodą wszystkich zaplanowanych w eksperymencie związków, pomimo zastosowania modyfikacji metody, jak również wielu prób rozdziału mieszanin poreakcyjnych. Jeden ze związków a mianowicie chlorek 5-metylo-12*H*-chino[3,4-*b*]pirydo[3,4-*e*][1,4]tiazyniowy otrzymano nieopisaną dotychczas metodą, choć z niską wydajnością. Celem potwierdzenia mechanizmu reakcji Doktorantka podjęła próbę wyodrębnienia z mieszanin reakcyjnych tiolanów. Niestety powstawały one z tak niską wydajnością, że wyodrębnienie ich okazało się niemożliwe. Wobec tego przeprowadzono syntezę tiolanów na innej drodze. Tutaj również pojawiły się problemy z uzyskaniem czystych związków. Przeprowadzono więc reakcję alkilowania za pomocą siarczanu dimetylu otrzymując metylosiarczany 1-metylo-3-metylotio-4-(3-pirydyloamino)chinolinowe, które scharakteryzowano przeprowadzając je w odpowiednie pochodne 1,4-dihydrochinolinowe. Następnym etapem prac syntetycznych było odszczepienie chlorowodoru od otrzymanych chlorków obecności wodorowęglanu sodu. W ten sposób Doktorantka otrzymała pochodne 5-metylo-5*H*-chino[3,4-*b*]pirydo[5,6-*e*][1,4]tiazynowe oraz 5-metylo-5*H*-chino[3,4-*b*]pirydo[3,4-*e*][1,4]tiazynę. Pięć z nich Autorka poddała reakcji metylowania przy użyciu siarczanu dimetylu, dobierając eksperymentalnie warunki reakcji. W czterech przypadkach reakcja przebiegała jako proces N-metylowania na pirydynowym atomie azotu. W jednym przypadku zaobserwowano 2 produkty reakcji, jeden będący pochodną z grupą metylową przy atomie azotu N8 i drugi stanowiący wynik alkilowania tiazynowego atomu azotu. Struktura każdego otrzymanego związku została potwierdzona metodami spektralnymi. Dla dwóch chlorków 5-metylo-12*H*-chino[3,4-*b*]pirydo[5,6-*e*][1,4]tiazyniowych wykonano rentgenowską analizę strukturalną.

Analizując rozdział poświęcony badaniom własnym daje się zauważyć ogromną pracowitość Doktorantki. Opisuje, w sposób niezwykle szczegółowy, wszystkie etapy racjonalnie zaprojektowanej syntezy. W sytuacji pojawienia się trudności, Doktorantka nie rezygnowała, ale próbowała innych dróg czy też modyfikacji stosowanych metod. Świadczy to o ciekawości naukowej, co jest cechą niezwykle pożądaną. Zapewne jest to także wpływ promotora, dr. hab. Andrzeja Zięby świetnego chemika-syntetyka. Jako osoba zajmująca się syntezą organiczną mogę z całą odpowiedzialnością stwierdzić, iż została wykonana ogromna praca syntetyczna, której wyniki z pewnością posłużą innym naukowcom, zajmującym się

poszukiwaniem nowych, biologicznie aktywnych struktur chemicznych w grupie pochodnych fenotiazyny.

22 spośród otrzymanych związków przekazano do badań w kierunku aktywności cytotoksycznej. Oznaczenia wykonano w Zakładzie Biologii Komórki Wydziału Nauk Farmaceutycznych w Sosnowcu na 3 liniach komórek nowotworowych: raka płuc, raka piersi oraz glejaka a także jako odniesienia komórek prawidłowych fibroblastów skóry. Niektóre pochodne charakteryzowały się niskimi wartościami IC_{50} w stosunku do linii komórek nowotworowych, niestety również w stosunku do komórek prawidłowych. Brak selektywności działania często eliminuje związki z dalszych badań. Podjęto również próby korelacji aktywności cytotoksycznej z niektórymi deskryptorami molekularnymi obliczonymi (moment dipolowy, masa molowa, objętość, energia orbitali HOMO i LUMO) i wyznaczonymi eksperymentalnie (R_{M0} oraz logP). Analiza SAR wykazała brak korelacji.

Dodatkowo wykonano również badania aktywności przeciwdrobnoustrojowej wybranych pochodnych wobec kilku szczepów bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych. Właściwie tylko jeden związek wykazywał zadowalającą aktywność w stosunku do szczepu *Micrococcus luteus* ATCC 10240. Co prawda nie jest to typowy patogen, ale u pacjentów z obniżoną odpornością może się takowym stać.

Reasumując, w oparciu o przedstawione wyniki badań mogę stwierdzić, że cele pracy postawione sobie przez mgr Annę Empel zostały osiągnięte. Autorka przeprowadziła obszerną dyskusję wyników, wykazując się przy tym umiejętnością wyciągania adekwatnych wniosków.

Na koniec mam kilka uwag i pytań do Doktorantki.

1. Brakuje w pracy zaznaczenia, które z otrzymanych związków są znane, a które nowe.
2. Dlaczego dla kilkunastu związków nie wykonano widm ^{13}C NMR?
3. Dlaczego przyjęła Pani wydajności 100% dla pochodnych 10 jeśli to były oleje?
4. Proszę uzasadnić wybór związków do badań biologicznych.
5. W badaniach cytotoksyczności użycie cisplatyny jako leku referencyjnego ma sens tylko w przypadku linii komórek raka płuc. Dlaczego nie użyto jeszcze jakiegoś innego leku?
6. Skąd taka duża rozbieżność w wartościach IC_{50} dla cisplatyny? W każdej z trzech tabel wartości bardzo się różnią dla tych samych linii komórkowych.

7. W badaniach aktywności przeciwdrobnoustrojowej można byłoby zastosować jeszcze jeden antybiotyk. Gentamycyna nie należy do typowych leków stosowanych w zakażeniach bakteriami Gram-dodatnimi.
8. Szkoda, że Doktorantka nie umieściła opublikowanej pracy, której jak miemam jest współautorką, jako załącznika do rozprawy
9. I jeszcze w ramach ćwiczeń wzrokowych proszę znaleźć błędy na stronach: 31, 33, 38, 45, 48, 50, 76, 104, 105, 112.

Podsumowując, rozprawę doktorską oceniam wysoko, uważam ją za ciekawą oraz nowatorską, w pełni spełniającą warunki określone w art.13 ust.1 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (tj. Dz. U. z 2017 r., poz.1789). Mam zaszczyt przedstawić Radzie Dyscypliny Nauk Farmaceutycznych Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach wniosek o nadanie jej stopnia doktora nauk farmaceutycznych.

Stowilko Hujce